

Tierexperimentelle Untersuchungen
zur hyperthermen regionalen Zytostatikumperfusion
unter dem besonderen Aspekt der klinischen
und laborchemischen Ergebnisse

von
Heidrun Nagel
aus
Erlangen

1981
1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0088

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. F. P. Gall

**Tierexperimentelle Untersuchungen
zur hyperthermen regionalen Zytostatikumperfusion
unter dem besonderen Aspekt der klinischen
und laborchemischen Ergebnisse**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich - Alexander - Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Heidrun Nagel
aus
Erlangen

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker

Referent: Priv.-Doz. Dr. J. Tonak

Korreferent: Prof. Dr. F.P. Gall

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.1981

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

1. Einleitung	1 - 2
2. Die Hyperthermie als Therapie maligner Geschwülste	3 - 9
2.1. Geschichtliche Entwicklung	3
2.2. Die Wirkungsweise der Hyperthermie	4
2.3. Möglichkeiten der Wärme- applikation	5
2.4. Ausgangspunkte eigener Über- legungen	8
3. Experimenteller Teil	10 - 31
3.1. Die bei der hyperthermen Per- fusion verwendeten Geräte	10
3.2. Die Versuchstiere	17
3.3. Versuchsplan	18

	Seite
3.4. Durchführung der Versuche	20
3.5. Statistische Methoden	30
4. Ergebnisse	32 - 62
4.1. Allgemeine Ergebnisse	32
4.2. Komplikationen	33
4.3. Leckbestimmung	41
4.4. Temperaturmessung	42
4.5. Postoperative Schwellung der perfundierten Extremitäten	44
4.6. Laboruntersuchungen	47
4.6.1. Blutgasanalysen der Per- fusionslösungen	47
4.6.1.1. Der pH - Wert	47
4.6.1.2. Sauerstoffpartialdruck	51
4.6.1.3. Kohlendioxydpartialdruck	51
4.6.2. Hämoglobinbestimmung	53
4.6.3. Freies Hämoglobin im Serum	55

	Seite
4.6.4. Kaliumbestimmung	58
4.6.5. Lactatdehydrogenasebestimmung	60
5. Diskussion	63 - 71
6. Zusammenfassung	72 - 74
7. Literaturverzeichnis	75 - 83

1. Einleitung

Das maligne Melanom ist ein besonders bösartiger Hauttumor. Die Häufigkeit der Erkrankung an diesem Tumor ist weltweit im Steigen begriffen und liegt in Westeuropa bei derzeit 2 - 4 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner und Jahr.

Mit alleiniger chirurgischer Therapie konnten bisher 40 - 50 % aller Patienten auf Dauer geheilt werden.

Nach dem Schrifttum konnten bei Patienten mit Melanomen der Extremitäten wesentlich bessere Ergebnisse erreicht werden, wenn eine Überwärmung und Durchströmung mit hochdosierten kanzerotoxischen Substanzen erfolgte.

Bei dieser sogenannten regionalen hyperthermen Zytostatikumperfusion wird eine tumorbefallene Gliedmaße von der Gefäßversorgung des Rumpfes isoliert und mit Hilfe eines extrakorporalen Kreislaufes durchspült und erwärmt. Die vollständige Abriegelung des Rumpfes erlaubt die Anwendung sehr hoher Mengen an Zytostatikum in der

Extremität ohne die Gefahr negativer Auswirkungen auf den Gesamtorganismus befürchten zu müssen. Die Erwärmung bis ca. 42° Celsius führt zu einer weiteren selektiven Tumorzellzerstörung.

Diese adjuvante Behandlungsmethode wurde in Erlangen als erste Klinik in Deutschland im Jahr 1975 eingeführt und bis zum August 1979 bei 142 Patienten angewandt. Ernste Nebenwirkungen an dem mitbehandelten gesunden Gewebe haben bisher eine breite klinische Anwendung verhindert.

So wurden vor allem erhebliche Schwellungszustände der Extremitäten, Nervenschäden und begrenzte Gewebesnekrosen, die in Einzelfällen eine Amputation erforderlich machten, beobachtet. Auch Todesfälle, die auf die Behandlung zurückzuführen waren, wurden berichtet.

Gegenstand dieser Arbeit ist es, aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen die Auswirkungen der hyperthermen Extremitätenperfusion auf gesundes Gewebe näher zu untersuchen und Möglichkeiten zur Verminderung unerwünschter Nebenwirkungen aufzuzeigen.

2. Die Hyperthermie als Therapie maligner Geschwülste

2.1. Geschichtliche Entwicklung

Unter dem Begriff der Hyperthermie verstehen wir die Erhöhung der Gesamttemperatur oder der lokalen Tumortemperatur bei Warmblütlern auf über 37°C . Von milder Hyperthermie sprechen wir bei Temperaturen zwischen 39°C und 41°C , ab 42°C von einer Extremhyperthermie (Dietzel 1978). Seit langem ist die Möglichkeit bekannt, maligne Tumore mit Hyperthermie zu behandeln. Die Auswirkungen der Überwärmung wurden in den letzten 15 - 20 Jahren naturwissenschaftlich - medizinisch untersucht. Dabei zeigte sich, daß der Zellstoffwechsel Karzinomzellen bei Temperaturen um 42°C irreversibel geschädigt wird, der Stoffwechsel gesunder Zellen dahingegen unbeeinflußt bleibt (Crile 1962, Crile 1963, Ben Hur et al. 1978, G. M. Hahn 1978). Bei einer Temperaturüberschreitung von 43°C ist eine selektive Tumorzellzerstörung nicht mehr gewährleistet, da ab dieser Temperatur auch gesunde

Zellen nachhaltig zerstört werden (Harisiadis et al. 1975). Ein verstärktes Tumorstadium und früher auftretende Metastasen wurden aufgrund gesteigerter Stoffwechselvorgänge und Selektivierung unempfindlicher Tumorzellen bei Wärmeanwendung zwischen 38°C und $41,5^{\circ}\text{C}$ beobachtet (Dickson 1977, Palzer und Heidelberger 1973, Skipper 1968).

2.2. Die Wirkungsweise der Hyperthermie

Die Wirkungsweise der Hyperthermie auf Zellen und der Mechanismus der Tumorzellzerstörung sind noch nicht vollständig geklärt.

Bei Untersuchungen zeigte sich, daß hypoxische Zellen durch Wärme stärker inaktiviert werden als euoxische Zellen (Schulmann und Hall, 1974). Da das Tumorzentrum häufig aufgrund des Abstandes der vom Rand her einstrahlenden Blutgefäße ungenügend mit Sauerstoff versorgt wird, können die hypoxischen Zellen des Tumorzentrums durch Überwärmung effektiver in ihrem Stoffwechsel geschädigt werden als gut mit Sauerstoff versorgte Zellen.

Damit übereinstimmend wurde eine gesteigerte Wärmeempfindlichkeit maligner Zellen bei erniedrigtem intrazellulären pH - Wert festgestellt (Gerweck et al. 1976, Freeman et al. 1977, Overgaard 1977).

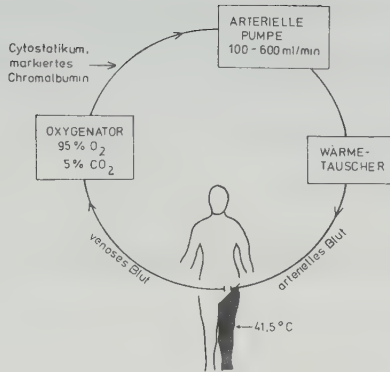
2.3. Möglichkeiten der Wärmeapplikation

Bei der Hyperthermie unterscheidet man zwischen Ganzkörper- und Lokalhyperthermie. Mit warmen Wasserbädern oder durch warme Luftströmungen wird die Ganzkörpererwärmung praktiziert. Die Behandlungsmethode ist wegen der bei steigenden Temperaturen auftretenden Komplikationen und Gefahren nicht unbegrenzt anwendbar. Die Lokalhyperthermie wird noch gelegentlich mit Wasserbädern durchgeführt, doch meistens kommen die Ultraschall- und Hochfrequenztherapie zur Anwendung.

Die von uns bei den Experimenten und bei Perfusionen am Menschen angewendete regionale Hyperthermie stellt eine besondere Variante der lokalen Wärmeapplikation dar. Um die Tumorzellen nachhaltiger

zu inaktivieren, wird die hypertherme Perfusion mit einer Zytostatikumgabe kombiniert. Diese Behandlungsmethode wird zur Therapie maligner Tumore, wie maligne Melanome und Weichteilsarkome der Extremitäten angewendet.

Die Gefäßversorgung der Gliedmaße wird vom Gesamtkörperkreislauf isoliert und durch Kanülen und Schläuche mit einer Herz - Lungen - Maschine verbunden. Dieser Apparat übernimmt die Blutzirkulation und die Erwärmung der abgebundenen Gliedmaße. Der Temperaturanstieg erfolgt über das arterielle System, das damit das am stärksten wärmebelastete Gewebe darstellt. Folgende Abbildung verdeutlicht die hypertherme Zytostatikaperfusion.



SCHALTSHEMA EINER EXTREMITÄTENPERFUSION

Abb. 1: Schematische Darstellung einer Perfusion

Zur Unterbindung des Kollateralkreislaufes und zur möglichst optimalen Abriegelung des Extremitätenkreislaufes wird ein Tourniquet in der Leistenbeuge um das Bein gewickelt, fest angezogen und verknotet.

Die Kontrolle über die vollständige Isolation des Perfusionskreislaufes vom Gesamtkörperkreislauf erhält man aufgrund einer Messung mit einer radioaktiv markierten Substanz.

2.4. Ausgangspunkte eigener Überlegungen

Da noch keine ausreichend gesicherten Untersuchungen zur Auswirkung der Hyperthermie bestehen, bauten wir eine tierexperimentelle Versuchsreihe auf; deren Ziel war es, unter möglichst gleichen allgemeinen physiologischen und physikalischen Bedingungen die Ursache der perfusionsbedingten postoperativen Komplikationen näher einzugrenzen und gegebenenfalls zu klären, inwieweit die Hyperthermie und das Zytostatikum bei der Perfusion noch effektiver eingesetzt werden können, sofern sich die Ergebnisse auf den Menschen übertragen lassen.

Auf die Existenz eines Malignoms der Extremität konnten wir verzichten, da die Auswirkungen auf das gesunde Gewebe exploriert werden sollten.

Als Faktoren für die perfusionsbedingten Nebenwirkungen kommen das angewendete Zytostatikum, dessen Lösungsmittel (Propylenglycol), der extrakorporale Kreislauf und die Auswirkungen der Hyperthermie in Frage. Als Zytostatikum kam Melphalan (Alkeran^R), eine alkylierende Substanz, die in Pulverform vorliegt und vor der Injektion mit einer äthanolischen 2 %igen Chlorwasserstoff - Lösung gelöst und mit Propylenglycol und Aquadest auf 10 ml verdünnt werden muß, zur Anwendung.

3. Experimenteller Teil

3.1. Die bei der hyperthermen Perfusion verwendeten Geräte

Bei den tierexperimentellen Versuchen zur hyperthermen Perfusion kamen folgende Geräte zur Anwendung:

1. Beatmungsgerät
2. Blutgasanalysegerät
3. Thermosonden und Temperaturmeßgerät
4. Herz - Lungen - Maschine
5. Isotopenflußmeßgerät

1. Das Beatmungsgerät

Die Tiere wurden bei allen Versuchen mit einem Assistorgerät 640 der Firma Dräger, Lübeck beatmet.

2. Das Blutgasanalysegerät

Die Blutgaswerte erhielten wir von einem Gerät des

Typen AZ - Base Laboratory 1, Firma Radiometer, Kopenhagen errechnet.

3. Die Thermosonden und das Temperaturmeßgerät

Zur Bestimmung der erreichten Gewebetemperatur während der Perfusion dienten zwei Thermosonden (Thermocouple microprobe Type IT - 18, Bailey Instruments Inc. N.J. USA). Die von diesen Thermosonden ermittelten Temperaturen zeichnete ein Meßgerät der Firma Doric Scientific N.J. USA Modell 406 Trenticator Type 400 T/C auf. Dieses Gerät arbeitet in dem Temperaturbereich von 0 - 100°C und mit einer Meßgenauigkeit von $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

4. Die Herz - Lungen - Maschine

Abbildung 2 zeigt die verwendete Herz - Lungen - Maschine.

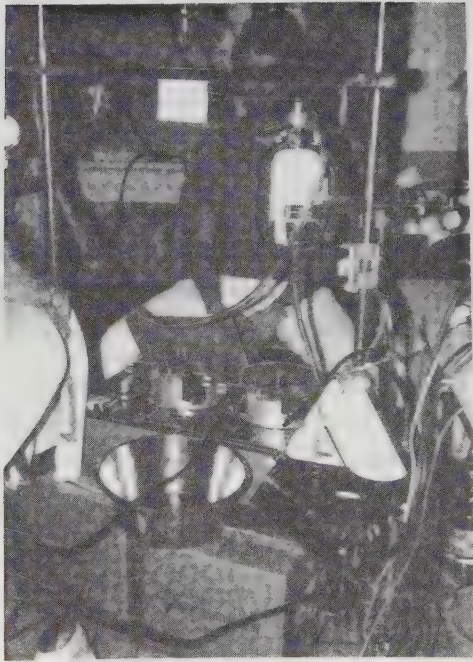


Abb. 2: Die verwendete Herz - Lungen - Maschine

Dieses bei den Versuchen verwendete Gerät besteht
im wesentlichen aus folgenden drei Teilen:

- einem Membranoxygenator
- einer Rollerpumpe
- einem Wärmeaustauscher

Als Oxygenator diente ein Membranoxygenator des Typ Q 130 der Firma Bentley Laboratories GmbH, Düsseldorf.

Die Sauerstoffzufuhr betrug 250 - 300 ml pro Minute. Dieses Gerät verfügt nicht über die Möglichkeit CO_2 beizumischen. Das venöse Blut durchlief vor Eintritt in den Oxygenator einen Filter, die Rollerpumpe, um Luft und Mikroembolien abzuscheiden. Hierzu diente ein kleines Erlanger Modell. Zur Erwärmung des Blutes auf die gewünschte Temperatur kam ein Wärmeaustauscher, den Wasser durchspülte, zur Anwendung. Um eine Hämodilution und somit einen Hämatokrit des Blutes der perfundierten Extremität von ungefähr 20 % zu erreichen, wurde die Herz - Lungen - Maschine vor der Perfusion mit 800 ml einer 5 %igen Glucose gefüllt. Die mittlere Durchflußgeschwindigkeit betrug bei sämtlichen Versuchen konstant 300 ml pro Minute.

5. Das Isotopenflußmeßgerät

Zur Kontrolle der Isolierung des Perfusionskreis-

laufes vom Gesamtkörperkreislauf wurde die Radioaktivität von einem Isotopenflußmeßgerät über dem Herzen bestimmt. Das Gerät war vom Typ Nukleopan 2 K der Firma Siemens. Die unten stehende Abbildung zeigt das Gerät.



Abb. 3: Das Isotopenflußmeßgerät

Die Meßkontrolle erfolgte nach einer von Stehlin (1961) und Schraffordt Koops (1972) veröffentlichten und von uns modifizierten Methode.

5 μ Ci radioaktives Chromalbumin wurden über einen peripheren Zugang in den Gesamtkörperkreislauf injiziert. Die dadurch hervorgerufene Impulszahl pro Minute (IPM) wurde über dem Herzen mit einem Gammadetektor registriert. Darauffolgend wurden 45 μ Ci radioaktives Chromalbumin in den Perfusionskreislauf gespritzt. Das Leck konnte somit aus dem Anstieg der Impulszahl pro Minute über dem Herzen wie folgt bestimmt werden:

N_0 = Background (natürliche Radioaktivität; wird vor der Injektion des radioaktiven Chromalbumins gemessen)

N_{10} = gemessene Impulszahl pro Minute nach der Injektion von 5 μ Ci radioaktivem Chromalbumin in den Gesamtkörperkreislauf (bis zur gleichmäßigen Aktivitätsverteilung im Blut wird einige Minuten bis zur Messung gewartet).

N_{100} = gemessene Impulszahl pro Minute nach Injektion von $45\mu\text{Ci}$ radioaktivem Chromalbumin in den Perfusionskreislauf .

Für die Berechnung gilt:

100 % Leck sind erreicht, wenn

$$N_{100} = N_{10} + 10 (N_{10} - N_0)$$

$$X = \frac{\text{Volumen im Körperkreislauf}}{\text{Volumen im Körperkreislauf} + \text{Volumen im Perfusionskreislauf}}$$

Das Gesamtblutvolumen wurde aus dem Körpergewicht des Versuchstieres zu 70 ml x kg / kg Körpergewicht berechnet. Das Blutvolumen in der hinteren perfundierten Extremität wurde mit 18 % des Gesamtblutvolumens nach der Neunerregel bestimmt.

Das theoretisch berechnete N_{100} wurde dem tatsächlich Gemessenen gegenübergestellt, für das wirklich gemessene Leck gilt:

$$\text{Leck} = \frac{\text{gemessenes } N_{100} - N_{10}}{100 \% \text{ berechnetes } N_{100} - N_{10}}$$

3.2. Versuchstiere

Um möglichst ähnliche Perfusionsbedingungen wie beim Menschen zu erreichen, und dadurch eine hohe Übertragbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Versuchstiere entsprechend ausgewählt. Maßgebend hierfür war die Größe und somit das Blutvolumen der Extremität. Unsere Wahl fiel auf Bastard - Schäferhunde beiderlei Geschlechts. In der Literatur (Burnett et al. 1976, Braasch 1964, Englund et al. 1974, Suzuki 1967, Moricca et al. 1977) wurde bereits erwähnt, Hunde eigneten sich besonders zur hyperthermen Extremitätenperfusion.

Das Durchschnittsalter der Bastard - Schäferhunde unserer Versuchsreihen betrug 2,8 Jahre $\pm$ 8 Monate. Die Tiere wogen zwischen 26 kg und 34 kg.

Die Haltung und Pflege der Versuchstiere erfolgte in Einzelboxen der tierexperimentellen Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen - Nürnberg.

3.3. Versuchsplan

Der Versuchszeitraum erstreckte sich vom 15.02.1978 bis 30.06.1979.

Wir teilten 45 Tiere in drei Hauptgruppen zu je 15 Tieren.

Innerhalb einer Hauptgruppe wurden noch drei Untergruppen mit verschiedenen Perfusionstemperaturen (37°C , 40°C und 43°C) zu je fünf Hunden unterschieden.

Alle Tiere wurden an der rechten hinteren Extremität operiert.

Die Versuchstiere der ersten Hauptgruppe wurden bei den drei verschiedenen Temperaturen ohne Zusätze perfundiert. Bei der zweiten Hauptgruppe wurde bei den drei Temperaturen in den Perfusionskreislauf das Lösungsmittel von Melphalan (Propylenpolycol) hinzugefügt.

Die letzte Hauptgruppe erhielt während der Perfusion mit den drei verschiedenen Temperaturen das Zytostatikum Melphalan in den Perfusionskreislauf.

Die Tabelle 1 auf Seite 19 gibt eine Übersicht des Versuchsplan.

Gewebetemperatur während der Perfusion	ohne Zusatz im Perfusionskreislauf	unter Zugabe des Lösungsmittels von Melphalan (Propylenglycol 2 ml/kg Körpergewicht)	unter Zugabe von Melphalan (2 mg/kg Körpergewicht)	Zahl der Hunde je Gruppe
normotherme Perfusion	37° C n = 5	37° C n = 5	37° C n = 5	n = 15
hypertherme Perfusion	40° C n = 5	40° C n = 5	40° C n = 5	n = 15
extrem hypertherme Perfusion	43° C n = 5	43° C n = 5	43° C n = 5	n = 15

Tab. 1: Versuchsplan der durchgeführten Perfusionen (n = 45)

3.4. Durchführung der Versuche

Die Perfusionen wurden im experimentellen Operationssaal der tierexperimentellen Abteilung der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen durchgeführt.

Die Perfusionsdauer wurde bei allen Tieren mit 60 Minuten festgelegt.

Präoperativ bekamen die Versuchstiere keine Medikamente.

Operiert wurden die Hunde in Intubationsnarkose. Als Narkotika wurden Trapanal^R und Lysthenon^R i.v. injiziert.

Die Beatmung während der Operation erfolgte mit dem bereits erwähnten Assistorgerät.

Die Tiere wurden auf dem Operationstisch in Rückenlage befestigt. Die rechte hintere Extremität wurde gründlich rasiert und das Operationsfeld in der rechten Leiste mit dem gesamten Hinterlauf mit Äther, Alkohol und Kodan desinfiziert und steril abgedeckt.

Abbildung 4 zeigt die Lagerung und Beatmung eines Tieres.



Abb. 4: Lagerung und Beatmung eines Versuchstieres

Nach Eröffnung der rechten Leiste mit einem unge-

fähr 10 cm langen Längsschnitt erfolgte die Freipräparierung der Arteria und Vena femoralis superficialis vom Ligamentum inguinale aus nach distal auf einer Strecke von ungefähr 10 cm.



Abb. 5: Darstellung der rechten Leistenbeugegefäße

Die zu perfundierende Extremität wurde durch temporäre Ligaturen der Seitengefäße vom Leistenband bis zu den späteren Kanülierungsstellen vollstän-

dig von der Gefäßversorgung des Rumpfes isoliert.

Bei den ersten drei Versuchen eröffneten wir die Arteria femoralis superficialis längs. Doch in allen drei Fällen auftretende starke Nachblutungen aus der Arterie, die zum Exitus der Tiere führten, veranlaßten uns von dieser Technik abzusehen. In zwei Fällen führten wir daraufhin eine vollständige Durchtrennung des Gefäßes nach Beendigung der Perfusion mit Rekonstruktion unter Dazwischenschaltung einer Goretex-Prothese, 3 mm im Durchmesser, und einer End-zu-End-Anastomose durch. Doch auch dieses Verfahren führte durch Thrombosierung der Arterie in Höhe der Prothese zum Exitus der beiden Versuchstiere.

Bei den folgenden Versuchen wurde die Arterie femoralis superficialis stets quer eröffnet und nach distal mit einem Plastikkatheter der Größe Charrière Nr. 12 kanüliert.

Die Eröffnung der Vena femoralis erfolgte in gleicher Höhe; bei den ersten zehn Hunden quer, später

bei allen Versuchen in Längsrichtung. Ein Plastik-katheter der Größe Charrière Nr. 16 diente zur Kanülierung.

Zur Abdichtung der kanülierten Arterie und Vene dienten je ein Merselenebändchen, das über einem Gummisteg fest angezogen wurde.

Eine Esmarchbinde wurde zur zusätzlichen Isolierung der Extremität von der Gefäßversorgung des Rumpfes als Tourniquet um die Leiste gebunden.

An den Kanülen wurden entsprechend ein arterieller und venöser Schlauch angeschlossen, die die isolierte Extremität mit der Herz - Lungen - Maschine verbanden.

Bei den Perfusionen mit 40° C und 43° C schützte eine um das Bein gelegte Metallfolie vor Wärmeverlusten.

Um eine Kontrolle über den Verlauf der gewünschten

Perfusionstemperatur zu erhalten, wurden unmittelbar nach Perfusionsbeginn zwei Thermosonden, eine in den Bereich des Oberschenkels, die andere in den des Unterschenkels eingebracht. Die erreichten Gewebetemperaturen zeichnete das bereits beschriebene Temperaturmeßgerät auf.

Zur Bestimmung der pH-, pCO_2 - und pO_2 -Werte wurde während der 60 - minütigen Perfusion zu drei Zeitpunkten, nämlich nach fünf Minuten, 30 Minuten und nach 55 Minuten Blut aus dem Perfusat entnommen. Das Ergebnis erhielten wir sofort mit Hilfe des Blutgasanalyseapparates. Bei starken Abweichungen des pH-Wertes vom Normwert erfolgte eine Korrektur mit Natriumbikarbonat.

Zusätzlich zu diesen Werten wurde bei den Tieren der zweiten und dritten Versuchsreihe, Perfusion mit Lösungsmittel beziehungsweise mit Melphalan, gleichzeitig mit den Blutgasanalyseproben Blut zur Bestimmung des Hämoglobins, Hämoglobins im Serum, Kaliums und der Lactatdehydrogenase aus dem Perfusionskreislauf und aus dem Körperkreislauf gewonnen.

Die Zeitpunkte der Blutentnahmen für die Untersuchungen zeigt Abbildung 6.

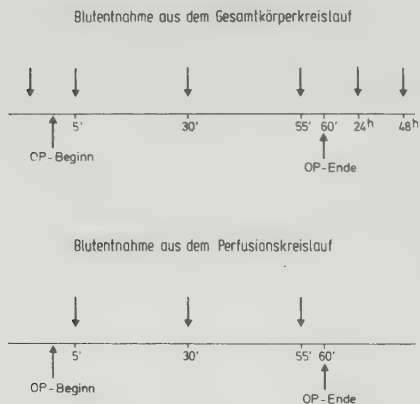


Abb. 6: Zeitpunkte der Laboruntersuchungen

Die Gerinnung im Gesamtkörperkreislauf während der Versuchsdauer wurde bei den ersten beiden Hunden durch die Gabe von 125 E Heparin pro Kilogramm Körpergewicht aufgehoben. Nach Beendigung des Versuches erfolgte eine Antagonisierung mit Protaminsulfat. Bei den restlichen Versuchen wurde von

einer medikamentösen Beeinflussung der Gerinnung des Gesamtkörperkreislaufes abgesehen. Alle Tiere erhielten jedoch 4000 E Heparin in den Perfusionskreislauf.

Die vollständige Isolierung der perfundierten Extremität gegen den Kreislauf des Rumpfes kontrollierte eine in 5-minütigen Abständen erfolgte Messung mit radioaktiv markiertem Chromalbumin (Cr^{51} Humanalbumin) durch das Isotopenflußmeßgerät.

Die Bestimmung von N_{100} ließ eine exakte Beurteilung des Grades der Vermischung der beiden Kreisläufe und damit indirekt die Menge des Zytostatikums, die in den Gesamtkörperkreislauf abgewandert ist, zu.

Die Extremität der Hunde 15 bis 25 wurde nach der Perfusion mit einer Ringer - Lösung gespült. Ab dem 26. Versuch kamen nur noch drei Liter einer 5 %igen Plasmaproteinlösung zur Anwendung. Bei den ersten 14 Versuchen wurde auf eine Spülflüssigkeit verzichtet.

Nach der Auswaschung der zurückgelassenen Bestandteile im Bein der Tiere wurden die temporären Gefäßligaturen und das Tourniquet wieder gelöst, die Perfusionskanülen aus der Arterie und der Vene entfernt und diese Gefäße mit einer fortlaufenden Naht mit Merselenefäden 6 x 0, BV1 geschlossen.

Für eine zweite Studie wurden je drei Gewebeproben einer kleinelumigen Arterie und Vene, einer Muskulatur, eines Nervens und der Haut distal der Kanülierungsstellen zur mikroskopischen, enzymhistochemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung perfusionsbedingter Veränderungen entnommen. Die Ergebnisse werden zur Zeit vom Pathologischen Institut der Universität Erlangen - Nürnberg ausgewertet; sie sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Bei den ersten 22 Hunden wurde die Wunde mit schichtweisen Nähten verschlossen. Ab Versuchstier 23 bedeckte der darübergezogene Musculus sartorius die freigelegte Arterie und Vene, darüber folgte die Hautnaht.

Während der Operation wurde den Tieren über eine periphere Vene 500 ml einer Elektrolytlösung (Tutofusin OPS, Pfrimmer) infundiert. Ab Mitte der Operation erhielten die Hunde zum Ersatz des während der Perfusion verloren gegangenen Blutes 400 ml Hundefrischblut.

Die gesamte Operation nahm 3 - 4 Stunden in Anspruch.

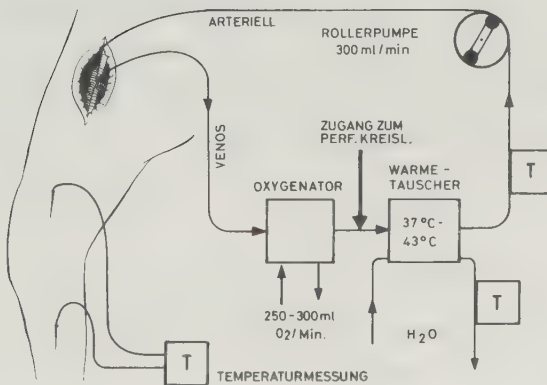


Abb. 7: Schematische Darstellung einer Extremitätenperfusion

An den postoperativen Tagen bekamen alle Hunde täglich eine Ampulle Chloramphenicol i.m. injiziert (1x1 g Paraxin^R).

24 und 48 Stunden nach der Perfusion wurde in Ergänzung zu den während der Operation gewonnenen Proben venöses Blut zur Hämoglobin, Hämoglobin im Serum, Kalium und Lactatdehydrogenase - Bestimmung abgenommen.

Am fünften postoperativen Tag erfolgte nach der Nervenleitgeschwindigkeitsmessung am freigelegten Nervus ischiadicus des perfundierten und des nicht perfundierten Beines in Intubationsnarkose, die Tötung der Tiere durch eine Überdosis Lystenon und Abstellen des Assistorgerätes.

3.5. Statistische Methoden

Folgende statistische Methoden kamen zur Ergebnissicherung zur Anwendung:

Der arithmetische Mittelwert berechnete sich nach folgender Formel:

$$M = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^n x_i$$

Die Standardabweichung des Einzelwertes wurde wie folgt berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (M - x_i)^2}{n - 1}}$$

Die mittlere Streuung des Mittelwertes ergab sich aus:

$$\sigma = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$$

Die statistische Absicherung zweier Mittelwerte gegeneinander erfolgte mit dem t-Test nach folgender Formel:

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{s_1^2 + s_2^2}}$$

4. Ergebnisse

4.1. Allgemeine Ergebnisse

In dem Versuchszeitraum von knapp 1 1/2 Jahren wurden insgesamt 66 Hunde perfundiert. 45 Tiere überlebten die geforderten fünf Tage und standen damit für die vollständige Durchführung aller geplanten, oben erwähnten, Untersuchungen zur Verfügung.

Die vorzeitig verstorbenen Tiere wurden in der Regel seziert. Diese Obduktionen wurden von Herrn Dr. Kaduk, Mitarbeiter des Pathologischen Institutes der Universität Erlangen - Nürnberg, vorgenommen.

Die Versuchstiere haben den 3 - 4stündigen Eingriff entsprechend gut toleriert; keines der Tiere ist während der Operation verstorben.

In der Regel standen die Hunde am Morgen des ersten postoperativen Tages wieder auf und liefen unter zumindest teilweiser Belastung des perfundierten Beines wieder in ihrer Einzelbox herum.

4.2. Komplikationen

Die 21 Versuchstiere, die die geforderten fünf Tage nicht überlebten, verstarben wegen verschiedener Ursachen. Tabelle 2 stellt diese tödlichen Komplikationen dar.

Tödliche Komplikationen bei

insgesamt 66 Perfusionen	n = 21	32 %
--------------------------	--------	------

diffuse Nachblutungen	n = 2	3 %
-----------------------	-------	-----

lokale Nachblutungen

- Gefäßwandnekrosen

Arterie	n = 3	11 %
Vene	n = 1	

- Nahtinsuffizienz

Arterie	n = 2	11 %
Vene	n = 1	

Nierenversagen	n = 5	7 %
----------------	-------	-----

unklare Ursachen	n = 7	11 %
------------------	-------	------

Tab. 2: Tödliche Komplikationen bei insgesamt 66 Perfusionen

Eine der häufigsten Todesursachen mit 14 % war die Nachblutung. Wegen diffuser Nachblutung aus dem Operationsgebiet verstarben die ersten beiden Hunde.

Bei diesen beiden Perfusionen hatten wir zur Vermeidung einer Thrombosierung zusätzlich zu dem Heparin des Perfusionskreislaufes 9000 E Heparin in den Gesamtkörperkreislauf gegeben. Trotz einer Antagonisierung mit 9 ml Protaminsulfat nach der Perfusion kam es zu diffusen Nachblutungen. Die Tiere sind am ersten beziehungsweise am zweiten postoperativen Tag verblutet. Als Ursache dafür wird die sehr geringe Steuerbarkeit der Blutgerinnung der Hunde angenommen.

Nachdem wir daraufhin bei den weiteren Experimenten auf eine Heparinisierung des Gesamtkörperkreislaufes verzichtet haben, traten derartige Komplikationen nicht mehr auf; wir stellten auch keine Thrombosierung im Gesamtkörperkreislauf fest.

Sieben Versuchstiere gingen uns durch lokale Nachblutungen der kanülierten Gefäße verloren. In eini-

gen Fällen kam es zum Durchschneiden der Gefäßnähte nach 3 - 4 Tagen und dadurch bedingt zu massiven arteriellen und venösen Nachblutungen. Durch die fast papierähnliche Beschaffenheit, den sehr hohen Anteil elastischer Fasern der Arterien und Venen beim Hund und der dadurch bedingten großen Zugspannung ist dies zu erklären. Auch die vollständige Durchtrennung der kanülierten Gefäße nach der Perfusion und Interponierung einer ungefähr 3 cm langen, im Durchmesser 3 mm großen Goretexgefäßprothese zur Verringerung der Zugspannung brachten nicht den erhofften Erfolg. Nach fünf Tagen waren die Kunststoffprothesen wohl aufgrund ihres geringen Kalibers in jedem Fall thrombosiert.

Da besonders häufig die Vene Ursache von Nachblutungen war, und hierbei die Spannung besonders groß war, sind wir von der Quer- zur Längsinzision übergegangen.

In drei Fällen war eine penetrierende Nekrose der Vorderwand der kanülierten Gefäße Grund tödlicher

Nachblutungen. Als Erklärung kann man höchstwahrscheinlich die Austrocknung und Druckschädigung der Gefäße während der Perfusion nennen. Zur Vermeidung dieser Komplikation haben wir beim Wundverschluß den lateral gelegenen Musculus sartorius über die Gefäße der Leistenbeuge genäht. Von den folgenden 44 Hunden, deren Wunde mit dieser Technik versorgt worden ist, verstarb keiner mehr frühzeitig an Nachblutungen.

Fünf Versuchstiere verstarben uns am ersten oder zweiten postoperativen Tag an einem Nierenversagen. Auffallend war, daß bei diesen Experimenten keine Spülung der Extremität mit Ringer-Lösung oder mit Plasmaproteinlösung erfolgt war. Aufgrund der durchgeführten Sektionen und feingeweblichen Untersuchungen der inneren Organe fand sich bei diesen Hunden als Todesursache eine Crush-Niere.

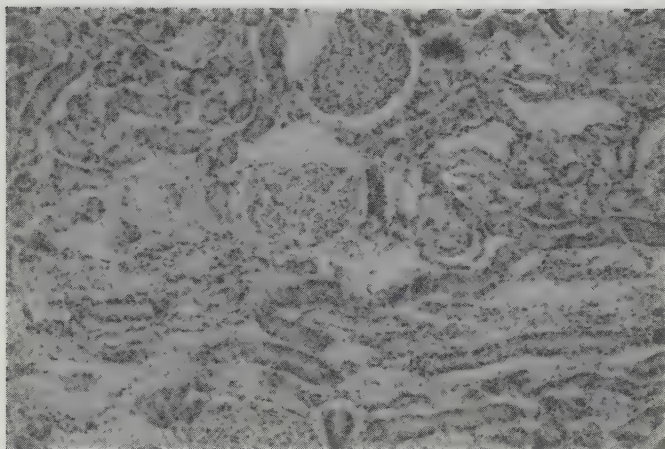


Abb. 8: Nierenpräparat des an einem Nierenversagen verendeten Hundes (Hund Nr. 13). Vergrößerung 1 : 32; Färbung Lepehne.
Die Tubuli sind verstrichen.



Abb. 9: Nierenpräparat (Hund Nr. 13); Vergrößerung 1 : 75, Färbung Lepehne.

In den Tubuli - Lichtungen sind grünlich - bräunliche Pigmenteinlagerungen zu erkennen.

Die bei vor allem hohen Temperaturen (43°C) in der Perfusionslösung stattfindende Hämolyse war die Ursache hierfür. Das freigewordene Hämoglobin gelangte bei Verzicht auf Spülung der Extremität in den Gesamtkörperkreislauf und verstopfte so in Form großer Pröpfe die unteren Segmente des Nephrons.

Der Zerfall der Erythrozyten und das dabei freiwerdende Hämoglobin waren einerseits durch die Herz - Lungen - Maschine und die damit verbundene mechanische Belastung der Erythrozyten und andererseits durch die hohe Temperatur der Perfusionslösung bedingt.

Aufgrund dieser Erkenntnis durchspülten wir bei allen weiteren Versuchen das Perfusat mit Hilfe der Herz - Lungen - Maschine gründlichst, um so möglichst die Perfusionslösung mit ihrem hohen Gehalt an zerstörten Erythrozyten zu entfernen. Nierenversagen als Todesursache wurde daraufhin nicht mehr nachgewiesen.

Keine eindeutige Todesursache konnte trotz der vorgenommenen Sektionen bei sieben frühzeitig verstorbenen Hunden festgestellt werden. Als Faktoren des Exitus konnten die sehr lange Operationszeit von 3 - 4 Stunden, das Narkosemittel und andere, nicht näher eingrenzbare Faktoren eine Rolle gespielt haben. Bei einem Hund handelte es sich um ein sehr altes Tier (12 Jahre), das während der Operation bereits Arrhythmien zeigte. Die Todesursache eines anderen Hundes ist möglicherweise in einer fehlerhaften Intubation oder postoperativen Hypoventilation und Hypostase zu sehen, da die Sektion einen atelektatischen rechten Lungenunterlappen zeigte.

4.3. Leckbestimmung

Bei einem überwiegenden Anteil der Versuche ergab die mit radioaktivem Chromalbumin vorgenommene Bestimmung ein Leck von 0 - 1 %. Nur bei zwei Hunden trat ein Leck von über 20 % auf. Die nachfolgende Tabelle verdeutlicht die Ergebnisse:

gemessenes Leck in %	0 - 1 %	2 - 6 %	7 - 20 %	über 20 %
	n = 24	n = 13	n = 6	n = 2
	53 %	29 %	13 %	5 %

Tab. 3: Ergebnisse der Leckbestimmung bei
45 Hunden

4.4. Temperaturmessung

Die Temperaturbestimmung mit zwei Thermosonden zeigte, daß die gewünschte Gewebetemperatur der perfundierten Extremität in der Regel erst nach einer Perfusionslaufzeit von 15 Minuten erzielt wurde. Bei den extrem hyperthermen Perfusionen mit 43°C wurde eine homogene Gewebetemperatur an Oberschenkel und Unterschenkel erst nach 30 Minuten erreicht. Als Erklärung hierfür kann man die Dauer zwischen der Abklemmzeit der Gefäße und dem Anschluß der Extremität an die Herz - Lungen - Maschine, dem Beginn des Perfusionskreislaufes und den in dieser Zeit stattgehabten Temperaturabfall in der Extremität auf teilweise unter 25°C heranziehen. Die zur Perfusion gewünschte Temperatur konnte bis auf eine Genauigkeit von $0,5^{\circ}\text{C}$ Abweichung reguliert und beibehalten werden.

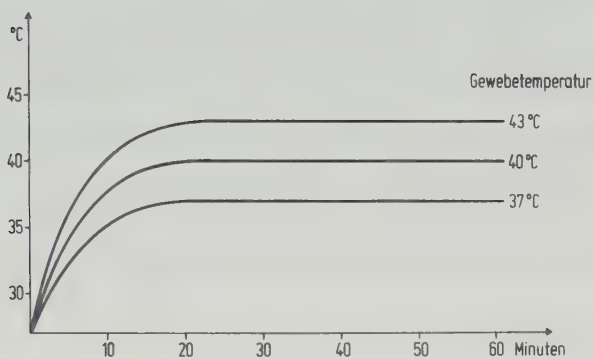


Abb. 10: Schematische Darstellung der durchschnittlich erreichten Gewebetemperatur bei den Perfusionen

4.5. Postoperative Schwellung der perfundierten Extremitäten

Nach der Perfusion trat bei allen 45 überlebenden Hunden eine mehr oder minder stark feststellbare ödematöse Schwellung der perfundierten Extremität auf. Diese entwickelte sich unterschiedlich schnell; bei den meisten Versuchstieren entstand das Ödem bereits unmittelbar nach Beendigung der Perfusion, selten erst am nächsten Morgen. Die Tabelle 4 auf Seite 46 gibt einen Überblick über eine graduelle Abschätzung der Schwellung am fünften postoperativen Tag zwischen einem leichten, mittelstarken und starken Zustand.

Auffallend ist, daß besonders bei denjenigen Tieren, die mit 43° C perfundiert wurden, am häufigsten eine starke Schwellung auftrat.

Ferner zeigte sich die Wahl der Spülflüssigkeit als besonders wichtig. Bei denjenigen zehn Hunden, deren perfundierte Gliedmaße mit Ringer-Lösung

ausgewaschen wurde, stellte sich teilweise schon während des Spülvorganges eine deutliche Anschwellung der Extremität dar. Während des Spülens mit Humanplasmaproteinlösung fanden wir derartige Erscheinungen in wesentlich geringerem Ausmaß. Die Ursache dafür mag darin liegen, daß ein Abwandern von Flüssigkeit über die von der Perfusion etwas lädierten Gefäßwände durch den erhöhten kolloidosmotischen Druck der Plasmaproteinlösung vermieden wird. Es ist sogar eine gewisse Resorption von während der Perfusion entstandenen interstitiellen Ödemen denkbar.

Tabelle 4 auf Seite 46 stellt das Ausmaß der Schwellungszustände nach den Perfusionen in Abhängigkeit von den drei Temperaturen bei 45 Hunden dar.

Ausmaß der Schwellung nach Perfusion	37° C	40° C	43° C
	n = 15	n = 15	n = 15

leicht	n = 8	n = 4	n = 1
n = 13			
(29 %)			

mittelstark	n = 6	n = 4	n = 4
n = 14			
(31 %)			

stark	n = 1	n = 7	n = 10
n = 18			
(40 %)			

Tab. 4: Schwellung der perfundierten Extremität
bei 45 Hunden in Abhängigkeit von der
Temperatur

4.6. Laboruntersuchungen

4.6.1. Blutgasanalysen der Perfusionslösung

4.6.1.1. Der pH - Wert

Zu drei Zeitpunkten der Perfusion, nach 5 Minuten, 30 Minuten und nach 55 Minuten, wurden bei allen Versuchen aus dem arteriellen Teil des Perfusats Proben zur Blutgasanalyse entnommen. Der 5 Minuten nach Perfusionsbeginn gemessene pH - Wert lag fast immer in saurem Milieu; der Mittelwert aller Perfusionen betrug $7,15 \pm 0,12$. Zu diesem Absinken des pH - Wertes kam es in Abhängigkeit von der zwischen der Abklemmung der Gefäße der zu perfundierenden Extremität, dem Anschluß an die Herz - Lungen - Maschine und dem damit verbundenen Perfusionsbeginn, verstrichenen Zeit. Durchschnittlich wurden für diesen Operationsteil 15 - 20 Minuten benötigt. Während dieser Zeit entstand in der Extremität eine Hypoxie mit pCO_2 - Anstieg und pH - Abfall.

Abbildung 11 zeigt die Mittelwerte der pH - Messung in Abhängigkeit von der Zeit - 5 Minuten, 30 Minuten, 55 Minuten nach Perfusionsbeginn - und von der gewählten Perfusionstemperatur - 37° C; 40° C und 43° C.

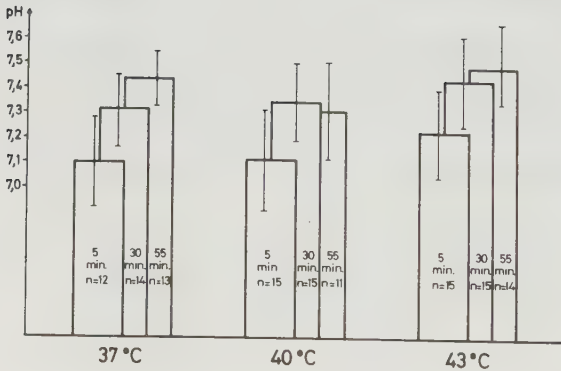


Abb. 11: Mittelwerte der pH - Messungen bei 45 Perfusionen

In Bezug auf die Temperatur erhielten wir keine Veränderung des pH - Wertes, da durch die Gabe von Natriumbikarbonat der niedrige pH - Ausgangswert in den physiologischen Bereich angehoben wurde.

Nach 30 Minuten beziehungsweise nach 55 Minuten lag der pH - Wert, in Abbildung 11, Seite 48, zu erkennen, zwischen 7,3 und 7,48. Aufgrund der Natriumbikarbonatgabe kann über die Veränderung des pH - Wertes während der Perfusion in Bezug auf die Abhängigkeit von der Temperatur oder von Propylenglykol oder von Melphalan keine Aussage getroffen werden.

Bei sechs Hunden, deren pH - Ausgangswert während der Perfusion nicht durch Natriumbikarbonatgabe beeinflusst wurde, zeigt Tabelle 5 den sich nur gering nach oben verändernden pH - Wert.

Perfusions- temperatur	5 Minuten	30 Minuten	55 Minuten
37° C	7.24	7.32	7.33
40° C	7.01	7.04	6.89
40° C	7.32	7.27	7.22
40° C	6.97	7.18	7.40
40° C	7.13	7.48	7.43
43° C	7.10	7.33	7.34
Mittelwert	7.12	7.26	7.26
Standard- abweichung	0.13	0.15	0.20

Tab. 5: pH - Werte bei sechs überlebenden Hunden
während der Perfusion, bei denen der pH -
Ausgangswert nicht durch Natriumbikarbo-
natgabe korrigiert wurde

4.6.1.2. Sauerstoffpartialdruck

Um eine Hypoxie und damit eine Schädigung des Gewebes mit möglicher Nekrosenbildung zu vermeiden, lagen die arteriellen Sauerstoffpartialdrucke während der Perfusion bei Werten zwischen 150 mm Hg und 300 mm Hg. Die durchschnittliche Sauerstoffzugabe im Oxygenator betrug 300 ml pro Minute und die Sauerstoffsättigung erreichte im Mittel 99 %.

4.6.1.3. Kohlendioxydpartialdruck

Die arteriellen Kohlendioxydpartialdrucke im Plasma lagen zwischen 22 mm Hg und 46 mm Hg.

Abbildung 12 stellt dar, daß die Ausgangswerte, gemessen nach 5 Minuten nach Perfusionsbeginn, der einzelnen Temperaturen keine wesentlichen Veränderungen zeigen.

Auch waren keine wesentlichen Unterschiede des $p\text{CO}_2$ bei den Perfusionen mit Lösungsmittel beziehungsweise mit Melphalan im Vergleich zu den Perfusionen ohne Zusätze zu erkennen.

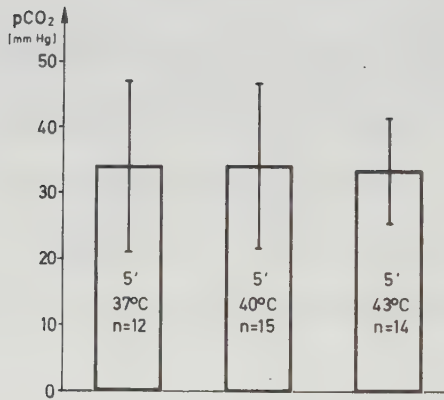


Abb. 12: Mittelwerte der $p\text{CO}_2$ - Ausgangswerte, gemessen 5 Minuten nach Perfusionsbeginn, aller Perfusionen in Abhängigkeit von den drei Temperaturen 37° C, 40° C und 43° C

4.6.2. Hämoglobinbestimmung

Im Perfusionskreislauf

Da wir eine Hämodilution bei der Durchführung der Perfusionen erstrebten, lagen der gemessene Hämoglobinwert von durchschnittlich 8 - 9 g % und der Hämatokrit von 20 % zu Beginn und während der Perfusion im erwünschten Bereich.

Im Körperkreislauf

Bei der zweiten und dritten Versuchsgruppe wurde auch der Hämoglobingehalt des Gesamtkörperkreislaufes bestimmt. Eine wesentliche Änderung ist während und nach der Perfusion nicht eingetreten. Gegen Ende der Perfusion nahmen die Werte leicht zu, um dann nach 24 Stunden den größten Wert zu erreichen und nach 48 Stunden annähernd auf die Ausgangspunkte abzunehmen. Der durch die Spülung der Extremität entstandene Blutverlust wurde offensichtlich durch die Gabe von 400 ml Hundefrischblut vor Ende der Operation vollständig ausgeglichen.

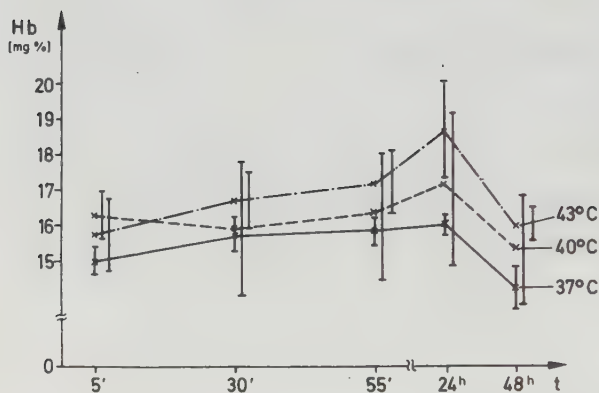


Abb. 13: Mittelwerte der Hämoglobinbestimmungen des Gesamtkörperkreislaufes bei verschiedenen Temperaturen der Versuchsgruppen 2 und 3

4.6.3. Freies Hämoglobin im Serum

Im Perfusionskreislauf

Das gemessene freie Hämoglobin im Serum des Perfusionskreislaufes stieg während der Operation auf das Doppelte des Ausgangswertes an. In Abhängigkeit von den drei Temperaturen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede bei den Perfusionstemperaturen zwischen 37°C und 40°C . Auffallend stark stiegen die Werte des freien Hämoglobins im Serum bei der Gewebetemperatur von 43°C . Aufgrund erheblicher Schwankungen der Einzelwerte sind die Ergebnisse nicht signifikant verschieden. Ein Vergleich der Werte zwischen der Perfusionen mit und ohne Melphalangabe zeigten keine unterschiedlichen Ergebnisse.

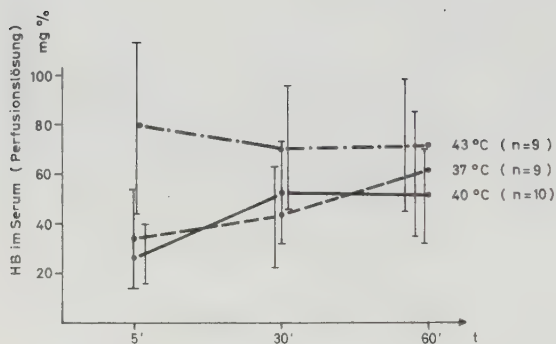


Abb. 14: Mittelwerte der Hämoglobinbestimmungen im Serum der Perfusionslösung bei verschiedenen Temperaturen der Versuchsgruppen

Im Gesamtkörperkreislauf

Das der Versuchsgruppen 2 und 3 bestimmte Hämoglobin im Serum des Gesamtkörperkreislaufes blieb während der Perfusion, sowie 24 beziehungsweise

48 Stunden nach der Operation in Abhängigkeit von den verschiedenen Gewebetemperaturen kaum beeinflußt. Aufgrund starker Schwankungen der Einzelwerte ergaben sich auch bei dieser Laboruntersuchung keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15).

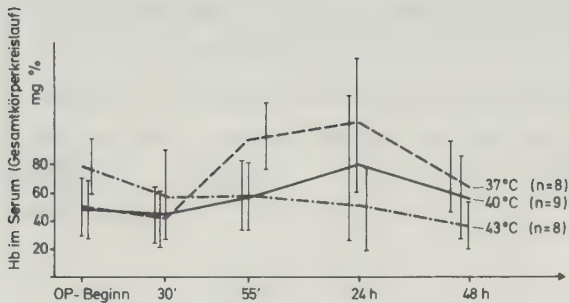


Abb. 15: Mittelwerte der Hämoglobinbestimmungen im Serum des Gesamtkörperkreislaufes bei verschiedenen Perfusionstemperaturen der Versuchsgruppen 2 und 3

4.6.4. Kalium

Im Perfusionskreislauf

Der niedrige Wert, der nach 5 Minuten nach Perfusionsbeginn bestimmt wurde, war aufgrund der Hämodilution im Perfusat zu erwarten.

Die weiteren Kaliumbestimmungen nach 30 Minuten und nach 55 Minuten zeigten, daß der Ausgangswert während der Perfusion kontinuierlich anstieg.

In folgender Tabelle ist zu erkennen, daß das Kalium bei höheren Temperaturen größere Werte erreicht und stärker zunimmt als bei niedrigen Temperaturen.

Zeit der Proben- abnahme	37° C n = 9	40° C n = 10	43° C n = 10
5 Minuten	2,70	2,45	2,75
30 Minuten	3,80	4,25	4,90
55 Minuten	4,25	4,65	4,65
Mittelwert	3,58	3,78	4,10
Standard- abweichung	0,79	1,17	1,17

Tab. 6: Mittelwerte der Kaliummessungen in
mmol/l in Abhängigkeit von den ver-
schiedenen Temperaturen

Im Körperkreislauf

Ähnlich den Hämoglobinwerten und den Werten des Hämoglobins im Serum, zeigen die Kaliumwerte im Körperkreislauf keine Abhängigkeit von der Perfusionsdauer und Perfusionstemperatur. Sie betrugen durchschnittlich zwischen 3,6 mg % und 4,5 mg %.

4.6.5. Lactatdehydrogenase

Im Perfusionskreislauf

Wie Abbildung 16 (Seite 61) zeigt, erhielten wir folgende Lactatdehydrogenasewerte:

Die Ausgangswerte bei den drei Temperaturen betrugen zwischen 46 U/l bei 37° C und 83 U/l bei 43° C. Bei Operationsende hatten sich diese Ausgangswerte ungefähr verdoppelt.

Bei der Perfusion mit der Gewebetemperatur von 43° C stieg der Ausgangswert innerhalb der ersten 30 Minuten deutlich stärker an als bei niedrigen Temperaturen. Aufgrund der starken Streuung der Einzelwerte sind diese Unterschiede jedoch nicht signifikant verschieden.

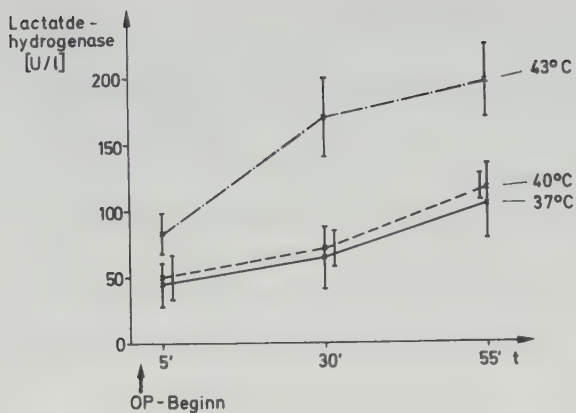


Abb. 16: Mittelwerte der Lactatdehydrogenase-messungen in U/l aus den Perfusions-lösungen

Im Gesamtkörperkreislauf

Die im Gesamtkörperkreislauf bestimmte Lactatdehydrogenase zeigt innerhalb der jeweiligen Temperatur nur einen geringen Anstieg der Werte.

Jedoch liegen die Werte bei den Perfusionen mit 43° C im Schnitt um 100 U/l höher als die Werte bei den Perfusionen mit 37° C beziehungsweise 40° C; die Werte der letzten beiden Temperaturen variieren unwesentlich.

5. Diskussion

Die hypertherme Zytostatikumperfusion bei high risk Melanomen der Stadien I und II einer Extremität erhöht die bis jetzt an der Chirurgischen Universitätsklinik Erlangen - Nürnberg untersuchte 3 - Jahres - Überlebensrate signifikant. Bedauerlicherweise lassen die bereits erwähnten Komplikationen wie Schwellungszustände, Nervenlähmungen, Nachblutungen, Thrombosen, Parästhesien diese Therapie noch nicht weitläufiger einsetzen.

Die von uns durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen sollten in erster Linie die Frage, welche Faktoren für diese unerwünschten Nebenwirkungen am gesunden Gewebe in Frage kommen, und welche Konsequenzen daraus für die Perfusion beim Menschen gezogen werden können, klären.

Sieben unserer operierten Hunde sind uns aufgrund einer Nachblutung verstorben. Diese Todesursache

konnte erst bei schonendstem Umgang der Gefäße, Querspaltung der Arterie, Längsspaltung der Vene, subtilster Nahttechnik und dem Wundverschluß mit Musculus sartorius Plastik, ein von Weese (1975) erwähntes Verfahren, vollständig verhindert werden.

Diese Muskelplastik bietet, treten postoperative Wundinfektionen in der Leiste auf, einen zusätzlichen Schutz vor einer septischen Nachblutung.

An einem auftretenden Nierenversagen sind uns in der ersten Versuchsreihe fünf Tiere frühzeitig verstorben. Ursache dafür war eine starke Hämolyse, die zu einer Crush-Niere führte. Zu dieser zum Teil erheblichen Hämolyse kam es sowohl durch das Erhitzen des Perfusats als auch durch die mechanische Irritation der Erythrozyten über die Herz - Lungen - Maschine. Laborwerte, wie das freie Hämoglobin und der Kaliumspiegel im Serum waren dafür aussagekräftige Parameter. Nach Moricca (1977), der über ähnliche Beobachtungen berichtete, sei Vollblut für Perfusionen nicht

geeignet. Nachdem wir aber bei den restlichen Versuchsgruppen aufgrund der Hämodilution einen Hämatokrit im Perfusionskreislauf von durchschnittlich 20 % erreichten, und wir nach Beendigung der Perfusion das Bein einem Spülvorgang unterzogen, um so sicherzugehen, daß sämtliche Hämolyseabfallprodukte entfernt wurden, ging uns kein Hund mehr an einem Nierenversagen verloren.

Die starke Hämolyse, vor allem in dem Temperaturbereich von 43°C , stellt auch eine Ursache für die Gewebsnekrosen dar (Krementz et al. 1972, Schraffordt Koops et al. 1977, Stehlin et al 1975, Reemtsma 1960).

Wir selbst beobachteten bei einem Hund schwere Gewebsnekrosen, dessen Perfusat versehentlich auf über 45°C aufgeheizt worden war.

Nach den Vorstellungen von Braasch (1964) kommt es bei isolierten Hundeextremitätenperfusionen im Temperaturbereich im extrakorporalen Kreislauf zu einem schnellen Anstieg des peripheren Widerstandes. Braasch nimmt an, daß die stärker quellenden

Erythrozyten die kapilläre Endstrombahn blockieren und dadurch den Zusammenbruch der Durchblutung im Endstromgebiet herbeiführen. Der bei massiven Hämolysen reichlich auffindbare Zelldetritus ist für eine weitere Störung der Mikrozirkulation verantwortlich. Die dadurch bedingte lokale Hypoxie führt vermehrt zu einer Schwellung und in ausgeprägten Fällen zu einer Nekrose des betroffenen Bezirkes.

Wir selbst konnten bei unseren Experimenten durch das weitgehende Auswaschen der Erythrozytenfragmente und von anderem Zelldetritus aus dem Gefäßsystem der Gliedmaße, auch bei Temperaturen von 43° C, eine derartig starke Gewebsläsion vermeiden.

Als Parameter der Hämolyserate ließen wir Hämoglobin, Hämoglobin im Serum, Kalium und die Lactatdehydrogenase sowohl im Perfusionskreislauf als auch im Gesamtkörperkreislauf bestimmen. Die niedrigen Ausgangswerte dieser Parameter sind aufgrund der praktizierten Hämodilution als normal zu werten. Der starke Anstieg des freien

Hämoglobins im Serum, des Kaliums und der Lactatdehydrogenase im Perfusionskreislauf, vor allem bei höheren Temperaturen, weisen auf eine deutliche Zellschädigung hin. Aufgrund des übereinstimmenden Verlaufs dieser drei Parameter handelt es sich hierbei vorwiegend um eine Hämolyse. Wie bereits oben erwähnt, ist die erhebliche Hämolyse auf die Hyperthermie des Perfusats und auf das mechanische Trauma der Erythrozyten beim Durchlauf durch die Herz - Lungen - Maschine zurückzuführen.

Ham et al. (1948) beschrieb dahingegen, daß die Erythrozyten von Hunden erst jenseits der 47°C - Grenze morphologische Veränderungen aufweisen.

Das von uns gewählte Perfusionsminutenvolumen von 300 ml/min gewährleistete eine ausreichende Erwärmung des zu perfundierenden Gewebes; dies wäre bei einem geringeren Minutenvolumen nicht zu sichern gewesen. Außerdem stellten Creech (1966) und Boeckl (1965) fest, daß ein erhöhtes Perfusionsminutenvolumen über den zwangsläufig erhöhten Druck im arteriellen Gefäßbett zu stärkeren Gewebsschäden führt.

Die Druckdifferenz zwischen systemischen Druck und Perfusionsdruck ist für die vollständige Isolierung der Extremität vom Gesamtkörperkreislauf von grosser Bedeutung (Rochlin et al. 1963). Mit dem Perfusionsminutenvolumen von 300 ml / min liegt der arterielle Druck im Perfusionskreislauf mit ungefähr 100 mm Hg knapp unter dem systemischen Druck.

Die vollständige Isolation der Extremität vom Gesamtkörperkreislauf erzielten wir durch ein Gummie-tourniquet und temporäre Gefäßligaturen. Die Effizienz dieser Technik wurde uns durch die Leckmessung aufgezeigt. Diese modifizierte Bestimmung mit radioaktiv markiertem Chromalbumin während der Perfusion ließ eine Undichtigkeit durch Anstieg der Impulse pro Minute über dem Herzen sofort erkennen. Geeignete Gegenmaßnahmen wie Überprüfen der Kanülierungsstellen oder Engerziehen des Tourniquets konnten bei erkennbarem Leck getroffen werden.

Die Wahl der Spülflüssigkeit am Ende der Perfusion

erwies sich als sehr relevant. Bei denjenigen Hunden, deren Extremität mit einer Ringer - Lösung gespült wurde, trat noch während des Spülvorganges eine starke Schwellung auf. Die durch die Perfusion erheblich erhöhte Gefäßpermeabilität und der niedrige onkotische Druck der Ringer - Lösung führten zu einem Austritt von Wasser in das Interstitium und verursachten somit die Entstehung von Ödemen. Nachdem wir die Extremität der Tiere mit 5 %iger Humanalbuminlösung auswuschen, wurde die Anzahl und das Ausmaß der postoperativ auftretenden Schwellungen wesentlich reduziert.

Die Durchblutung der Extremität bei der hyperthermen Perfusion wird wahrscheinlich durch lokale Stoffwechselprodukte gesteuert, da übergeordnete Regulationszentren während der Perfusion durch die Isolierung der Extremität vom Gesamtkörperkreislauf ausgeschaltet werden.

Eine Zunahme des peripheren Widerstandes im Perfusionskreislauf bei ansteigendem pH - Wert stellte Burnett et al. (1976) fest. Harken (1976)

fand einen verminderten Sauerstoffverbrauch bei sinkendem pH - Wert. Übereinstimmend mit Burnett et al. und Harken stellten wir bei denjenigen sechs Hunden, deren pH - Wert nicht mit Natriumbikarbonat korrigiert worden war, nur eine leichte Zunahme der pH - Werte auf durchschnittlich 7,3 fest. Dies verdeutlicht, daß die durch die Zeitspanne zwischen Abklemmung, Kanülierung und Perfusionsbeginn bedingte Azidose nicht durch Eigenregulation während der Perfusion korrigiert wurde. Wie sich uns zeigte, lassen sich die Blutgasanalysewerte im Perfusat in idealer Weise beeinflussen. Ein leicht erniedrigter pH - Wert für eine genügende Kapillardurchblutung, lassen sich somit als zusätzliche Hilfe zur Tumorzellzerstörung erzielen. Krementz et al. (1961) sowie Sachs et al. (1961) haben eine mit steigendem Sauerstoffpartialdruck steigende Aufnahme alkylierender Substanzen, wie Melphalan, in die Zelle festgestellt. Wir hielten den Sauerstoffpartialdruck, um eine Gewebshypoxie auszuschalten, mit Werten zwischen 150 mm Hg und 300 mm Hg sehr hoch. Vermeidung unphysiologischer

Situationen, gute Bedingungen für die Kapillardurchblutung und ein zusätzlicher tumorzellzerstörender Effekt lassen sich durch regelmäßige Blutgasanalysen während der Perfusion erzielen.

6. Zusammenfassung

Die tierexperimentellen regionalen hyperthermen Zytostatikumperfusionen wurden von uns durchgeführt, um die bei Menschen nach Perfusion postoperativ auftretenden Komplikationen einzugrenzen und zu klären. Nach Perfusionen traten vor allem begrenzte oder ausgedehnte Gewebnekrosen, die zu einer späteren Amputation zwangen, Nervenschäden und Schwellungszustände der Extremität auf. Da wir die Auswirkungen der Temperatur, des Lösungsmittels und des Zytostatikums auf das gesunde Gewebe untersuchen wollten, konnten wir bei den Versuchstieren auf eine an der Extremität vorhandene maligne Geschwulst verzichten. Bei allen Tieren wurde die rechte hintere Extremität von der Gefäßversorgung des Rumpfes isoliert und mit Hilfe eines extrakorporalen Kreislaufes über die Herz - Lungen - Maschine durchspült und erwärmt.

Die experimentellen Versuche ergaben, daß verfahren-

rensunspezifische Komplikationen, wie Nachblutungen und Thrombose der Gefäße durch eine geeignete Operationstechnik verhindert werden können.

Regelmäßige Blutgasanalysen der Perfusionslösung lassen unphysiologische Bedingungen, die durch stoffwechselabhängige Störungen der Kapillardurchblutung die Ursache der Gewebsnekrosen darstellen, erkennen und beeinflussen.

Neben der Höhe der Gewebetemperatur zeigte sich die Wahl der Spülflüssigkeit zum Auswaschen der Extremität nach Beendigung der Perfusion für das Ausmaß der ödematösen Schwellung des Hinterlaufes von besonderer Bedeutung.

Eine bessere Steuerung der Extremitätenperfusion ist aufgrund der Ergebnisse der von uns durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen möglich. Die die Operationsmethode belastenden Komplikationen konnten weitestgehend geklärt werden.

Die aufgrund der experimentellen Perfusion erzielten Erkenntnisse geben Hoffnung, die hypertherme Zytostatikumperfusion noch gezielter, mit reduzierter Komplikationsrate und noch weitläufiger beim Menschen als adjuvante Therapie des malignen Melanoms einsetzen zu können.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Ben - Hur, E.; Elkind, M. M.; Riklis, E.:
The combined effects of hyperthermia
and radiation in cultured mammalian
cells.
in: Cancer Therapy by Hyperthermia
and Radiation, Baltimore - München,
Urban & Schwarzenberg, 29 (1978)
- 2 Boeckl, O.: Probleme der regionalen Perfu-
sionstherapie maligner Tumoren.
Wien. klin. Wschr. 77, 856 (1965)
- 3 Braasch, D.: Zur Pathogenese des tödlichen
Kreislaufkollapses nach Überwär-
mung einzelner Organe auf 45° C.
Pflügers Arch. Physiol. 278, 567
(1964)

- 4 Burnett, H. F.; Marby, C. D.; Westbrook, K. C.;
Campbell, G. S.: Isolation regional
perfusion: an experimental study.
Surgical Forum 123 (1976)
- 5 Creech jr. O.; Krementz, E. T.: Techniques of
regional perfusion.
Surgery 60, 938 (1966)
- 6 Crile, G.: Selective destruction of cancers
after exposure to heat.
Ann. Surg. 156, 404 (1962)
- 7 Crile, G.: The effects of heat and radiation
of cancers implanted on the feet
of mice.
Cancer Res. 23, 372 (1963)

- 8 Dickson, J. A.: The effects of hyperthermia
in animal tumour systems.
in: Selective Heat Sensitivity of
Cancer Cells, Berlin - Heidelberg -
New York,
Springer 43 (1977)
- 9 Dietzel, F.: Thermo - Radio - Therapie.
München - Wien - Baltimore,
Urban & Schwarzenberg (1978)
- 10 Englund, N. E.; Hallböök, T.; Ling, L.;
Vang, J.: Skin and muscle blood
flow during regional perfusion
with hyperthermal perfusate.
- 11 Freeman, M. L.; Dewey, W. C.; Hopwood, L. E.:
Enhancement of thermal damage by
acidic milieu.
Radiat. Res. 70, 612 (1977)

- 12 Gerweck, L.; Rottinger, E.: Enhancement of
mammalian cell sensitivity to
hyperthermia by pH alteration.
Radiat. Res. 67, 508 (1976)
- 13 Hahn, G. M.: Interactions of drugs and
hyperthermia in vitro and in vivo.
in: Cancer Therapy by Hyperthermia
and Radiation, Baltimore - München,
Urban & Schwarzenberg 72 (1978)
- 14 Ham, T. H.; Shen, S. C.; Fleming, E. M.;
Castle, W. B.: Studies on the
destruction of red blood cells.
Blood 3, 373 (1948)
- 15 Harisiadis, L.; Hall, E. J.; Kraljevic, U.;
Borek, C.: Hyperthermia: biolo-
gical studies at the cellular level.

- 16 Harken, A. H.: Hydrogen ion concentration and oxygen uptake in an isolated canine hindlimb.
J. appl. Physiol. 40, 1 (1976)
- 17 Krementz, E. T.; Knudson, L.: The effect of increased oxygen tension on the tumoricidal effect of nitrogen mustard.
Surgery 50, 266 (1961)
- 18 Krementz, E. T.; Ryan, R. F.: Chemotherapy of melanoma of the extremities by perfusion: fourteen years clinical experience.
Ann. Surg. 175, 900 (1972)
- 19 Lehman, J. A.; Cross, F.; Richey, D. G.: Clinical study of forty - nine patients with malignant melanoma.
Cancer 19, 611 (1966)

- 20 Moricca, G.; Cavaliere, R.; Caputo, A.;
Colistro, F.: Hyperthermic treatment of tumours: experimental and clinical applications.
in: Selective Heat Sensitivity of Cancer Cells, Berlin - Heidelberg - New York,
Springer 112 (1977)
- 21 Overgaard, J.: Effect of hyperthermia on malignant cells in vivo.
Cancer 39, 2637 (1977)
- 22 Palzer, R. J.; Heidelberger, C.: Studies on the quantitative biology of hyperthermic killing of HeLa cells.
Cancer Res. 33, 415 (1973)
- 23 Petersen, N. C.; Bodenham, D. C.; Lloyd, O. C.:
Malignant melanomas in the skin.
Part. II. Brit. J. plast. Surg.
15, 97 (1962)

- 24 Reemtsma, K.: Complications of perfusion.
Cancer Chemother. Rep. 10, 75 (1960)
- 25 Rochlin, D. B.; Smart, C. R.; Shiner, J.:
The control of systemic admixture
during isolation perfusion.
Surg. Gynec. Obstet. 115, 71 (1963)
- 26 Sachs, D.; Shiner, J.; Bauer, R. D.; Rochlin,
D. B.: Isolation perfusion and
oxygen saturation.
Surg. Forum 129 (1961)
- 27 Schraffordt Koops, H.: Prevention of neural
and muscular lesions during hyper-
thermic regional perfusion.
Surg. Gynec. Obstet. 135, 401 (1972)

- 28 Schraffordt Koops, H.; Oldhoff, J.; van der Ploeg, E.; Vermey, A.; Eibergen, R.; Beekhuis, H.: Some aspects of the treatment of primary malignant melanoma of the extremities by isolated regional perfusion.
Cancer 39, 27 (1977)
- 29 Schulman, M.; Hall, E. J.: Hyperthermia: its effect on proliferative and plateau-phase cell cultures.
Radiology 113, 209 (1974)
- 30 Skipper, H.: Kinetic considerations associated with therapy of solid tumours.
in: The Proliferation and Spread of Neoplastic Cells, Baltimore, Williams and Wilkins 213 (1968)
- 31 Stehlin, J. S.; Clark, R. L.; Dewey, W. C.: Continuous monitoring of leakage during regional perfusion.
Arch. Surg. 83, 943 (1961)

- 32 Stehlin, J. S.; Giovanella, B. C.; de Ipolyi, P. D.; Muenz, L. R.; Anderson, R. F.: Results of hyperthermic perfusion for melanoma of the extremities.
Surg. Gynec. Obstet. 140, 339 (1975)
- 33 Suzuki, K.: Application of heat to cancer chemotherapy - experimental studies -.
Nagoya J. med. Sci. 30, 1 (1967)
- 34 Tonak, J.; Hermanek, P.; Groitl, H.: Malignant melanoma: microstages and individualized therapy.
Aust. N. Z. J. Surg. 48, 282 (1978)
- 35 UICC: Classification of malignant tumors.
3rd Edition, Genf, M. H. Harmer (1978)
- 36 Weese, K.: Chirurgische Erkrankungen der Haut.
in: Chirurgische Operationslehre,
Band 6, Leipzig, J. A. Barth 773
(1975)

Herrn Prof. Dr. med. F. P. Gall
danke ich für die freundliche Überlassung
eines Arbeitsplatzes seines Institutes.

Bei Herrn Priv. Doz. Dr. med. habil. J. Tonak
bedanke ich mich für dieses Thema und die
jederzeit hilfreiche Zusammenarbeit.

LEBENS LAUF

Name: Heidrun Nagel

geboren: 07. Februar 1956 in Erlangen

Wohnort: Feldstraße 12, 8521 Uttenreuth-Weiher

Vater: Wilhelm Nagel

Mutter: Loni Nagel, geb. Probst

Schule: Michael-Poeschke-Schule in Erlangen
Christian-Ernst-Gymnasium in Erlangen
Abitur am 20. Juni 1975

Universität: Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg, Medizin
(Wintersemester 1975/76)

Ärztliche Vorprüfung
am 31. August 1977

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
am 31. August 1978

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
am 22. August 1980

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
am 04. November 1981

